

Sveučilište u Splitu

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija

Medicinska laboratorijska dijagnostika

PROMJENE KOJE NASTAJU TIJEKOM ČUVANJA KONCENTRATA ERITROCITA

ZAVRŠNI RAD

MENTOR: Dr.sc. Slavica Dajak, dr.med.

STUDENTICA: Vladimira Martić

Ak. god. 2013 / 2014

Popis kratica

ACD – *engl. acid citrate dextrose*, sterilna otopina limunske kiseline, natrijevog citrata i dekstroze

AIDS – *engl. acquired immunodeficiency syndrome*, stečeni sindrom nedostatka imunosti

AST – aspartat aminotransferaza

ATP – adenzin trifosfat

CPDA – citrat, fosfat, dekstroza, adenin

DDK – dobrovoljni darivatelj krvi

DKS – diferencijalna krvna slika

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

2,3-DPG – 2,3 difosfoglicerat

EDTA – etilen diamin tetraoctena kiselina

Gy – grej (J/kg), apsorbirana doza zračenja

HIV – *engl. human immunodeficiency virus*, virus humane imunodeficijencije

LDH – laktat dehidrogenaza

MCH - *engl. mean corpuscular hemoglobin*, prosječan sadržaj hemoglobina u jednom eritrocitu

MCHC - *engl. mean corpuscular hemoglobin concentration*, prosječna koncentracija hemoglobina u 1L eritrocita

MCV - *engl. mean corpuscular volume*, prosječni volumen jednog eritrocita

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

RDW - *engl. red cell distribution width*, mjera varijabilnosti veličine eritrocita

RNK – ribonukleinska kiselina

SAGM – sukroza, adenin, glukoza, manitol

SADRŽAJ

1. Uvod	4
1.1. Eritrociti	5
1.1.1. Eritropoeza	5
1.1.2. Čimbenici koji utječu na stvaranje eritrocita	5
1.1.3. Građa eritrocita	7
1.1.4. Osobine eritrocita	10
1.2. Anemije	13
1.3. Krvni pripravci	15
1.3.1. Prikupljanje krvi za proizvodnju krvnih pripravaka	15
1.3.2. Testiranje krvi.....	16
1.3.3. Proizvodnja krvnih pripravaka	17
1.3.4. Čuvanje krvnih pripravaka	18
1.3.5 Koncentrati eritrocita	19
2. Cilj rada	22
3. Materijali i metode	23
4. Rezultati	25
5. Rasprava	38
6. Zaključci	41
7. Literatura	42
8. Sažetak	44
9. Summary	45
10. Životopis	46

1. UVOD

Transfuzijom krvnih pripravaka liječe se teški bolesnici pa je stoga krv dragocjen lijek kojim se spašavaju životi. Osnovna je funkcija krvi opskrba tkiva kisikom i hranjivim tvarima, kao i odstranjivanje ugljičnog dioksida i svih metaboličkih produkata.

Krv se sastoji od krvnih stanica i krvne plazme. Eritrociti, trombociti i leukociti su krvne stanice a krvna plazma je tekući dio krvi sastavljen od vode, ugljikohidrata, masti, bjelancevina, hormona, minerala i vitamina.

Krvni pripravci se pripremaju iz ljudske krvi. Zahvaljujući plemenitosti dobrovoljnih darivatelja krvi svaki bolesnik može dobiti kvalitetan sastojak krvi koji mu je potreban za liječenje. Obzirom da svaka transfuzija krvi mora biti sigurna i djelotvorna obvezno se provode laboratorijska ispitivanja svake doze darovane krvi na prisutnost uzročnika krvlju prenosivih bolesti, na prisutnost neuobičajenih protutijela te laboratorijsko ispitivanje krvnih grupa. Obrada i priprema doze krvnog pripravka započinje odmah po primitku doze krvi u laboratoriju transfuzijske ustanove.

Svaka uzeta doza krvi razdvaja se na više dijelova. Izdvajaju se stanice i plazma te tako izdvojene dijelove nazivamo krvnim pripravkom. Iz jedne doze krvi najčešće se dobivaju tri krvna pripravka i to koncentrat eritrocita, koncentrat trombocita i plazma.

Sve krvne stanice ne žive jednako dugo i zato je različita dužina čuvanja pojedinih krvnih pripravaka. Koncentrati eritrocita čuvaju se u hladnjacima na temperaturi od +2 do +6°C do 35 dana, koncentrati trombocita čuvaju se u posebnom inkubatoru na temperaturi od +22°C do 5 dana uz stalno miješanje. Plazma se smrzava u roku šest sati (svježe smrznuta plazma) ili se šalje na daljnju preradu.

Svaki sastojak krvi ima važnu ulogu u organizmu. Zato nedostatak bilo kojeg sastojka zahtijeva racionalnu i opravdanu kliničku primjenu krvnih pripravaka u dovođenju komponente koja nedostaje na vrijednosti koje zadovoljavaju fiziološke potrebe. U ovom radu bit će opisana uloga eritrocita, proizvodnja koncentrata eritrocita, njihovo čuvanje i promjene koje tijekom njihovog čuvanja nastaju a mogu biti značajne za kvalitetu transfuzijskog liječenja.

1.1. Eritrociti

Eritrociti su crvene krvne stanice. Najbrojnije su krvne stanice u organizmu. Broj eritrocita u zdravih osoba iznosi 4,2 do 6,2 x 10¹² / L a njihov životni vijek je 120 dana. Uloga eritrocita je vrlo važna jer oni sudjeluju u prenošenju kisika i ugljičnog dioksida u organizmu te u regulaciji pH krvi. Eritrociti se stvaraju procesom eritropoeze u koštanoj srži a njihova razgradnja se vrši u jetri.

1.1.1. Eritropoeza

Eritropoeza je regulirana potrebama tkiva za kisikom. U svim stanjima u kojima postoji manjak kisika (anemija, duži boravak na velikim visinama, bolesti cirkulacijskog i respiracijskog sustava) stvaranje eritrocita je ubrzano. Stanice eritrocitne loze razvijaju se iz pluripotentne matične stanice. Morfološki najnezrelija prepoznatljiva stanica eritrocitne loze jest proeritroblast. Sadrži veliku jezgru a time i velike količine ribonukleinske kiseline (RNK), izražene jezgrice i tanak sloj citoplazme. Izrazito je bazofilan. Bazofilni eritroblast je sljedeća stanica u razvoju. On je nešto manji od proeritroblasta i u tom se razvojnem stadiju počinje stvarati hemoglobin. Stanica zato gubi bazofiliju i postepeno prelazi u polikromatofilni eritroblast sa sivkastomodrom citoplazmom te u acidofilni eritroblast s acidofilnom citoplazmom. Acidofilni eritroblast gubi jezgru pa nastaje stanica bez jezgre, retikulocit, koji sadrži tek male količine ribonukleinske kiseline u stanici raspoređene poput mreže. Retikulocit još uvijek može sintetizirati hemoglobin a nakon 1 - 2 dana napušta koštanu srž te sazrijeva, uglavnom u slezeni, u zreli eritrocit pri čemu gubi RNK. Generacijsko vrijeme eritropoeze, tj. vrijeme potrebno da se iz proeritroblasta stvori zreli eritrocit iznosi oko 3 - 5 dana.(1)

1.1.2. Čimbenici koji utječu na stvaranje eritrocita

Za normalno odvijanje eritropoeze nužne su brojne tvari kao što su eritropoetin, metali (željezo, kobalt, mangan), vitamini (vitamin B12, vitamin C, vitamin E, vitamin B6,

folat, tiamin, pantotenska kiselina), aminokiseline, te različiti faktori rasta i hormoni. Nedostatak neke od ovih tvari može uzrokovati nastanak anemije.

Eritropoetin regulira stvaranje eritrocita, To je hormonalni faktor rasta krvnih stanica kojega stvaraju stanice bubrega i jetre ako je smanjena razina kisika u tkivima. Ako se zbog krvarenja ili nekog drugog razloga razvije anemija, koštana srž odmah počne stvarati veliku količinu eritrocita. Međutim, brzinu stvaranja eritrocita ne nadzire broj eritrocita u krvi nego njihova sposobnost prenošenja kisika do tkiva. Stoga, ako je funkcija eritropoetskog sustava očuvana hipoksija djeluje na porast proizvodnje eritropoetina a on povećava proizvodnju eritrocita sve dok hipoksija ne prestane.

Vitamin B12 i folna kiselina potrebni su za sintezu DNK pa će nedostatak ovih vitamina uzrokovati smanjenje količine DNK a time i poremećaje u sazrijevanju i diobi jezgre. Zato eritroblastične stanice postaju veće od normalnih i razvijaju se u megaloblaste s vrlo osjetljivom, krhkom membranom i kratkim životnim vijekom. Nemogućnost apsorpcije vitamina B12 iz probavnog sistema može biti izazvana atrofijom želučane sluznice i, posljedično, nedostatkom unutarnjeg faktora neophodnog za apsorpciju vitamina B12 pa se zbog toga razvija poremećaj u sazrijevanju eritrocita tj. perniciozna anemija.

Željezo je ključni dio molekule hemoglobina. Oko dvije trećine ukupne količine željeza u organizmu otpada na hemoglobinsko željezo. Obzirom da se željezo mora unositi hranom jer ga ljudski organizam ne stvara, nedostatan unos hranom dovodi do razvijanja sideropenične anemije. U hrani je željezo u trovalentnom obliku (feri) u kojem se ne može apsorbirati kroz membranu nego se mora reducirati u dvovalentni oblik (fero) što se događa uz pomoć enzima u stanicama stijenke duodenuma. Jedan dio tako apsorbiranog željeza odlazi se u rezerve u obliku feritina a većina se oksidira u feri oblik jer se samo trovalentno željezo veže za bjelančevinu transferin koja ga prenosi po organizmu i koja omogućuje unos željeza u stanice. Apsorpcija željeza regulirana je količinom željeza u rezervama, količinom željeza potrebnom za eritropoezu, hipoksijom ili upalnim procesima koji se razvijaju u brojnim bolestima. Najveća potreba za željezom je u koštanoj srži gdje se stvaraju eritrociti i hemoglobin.

Vitamin C je vitamin topiv u vodi. Ljudski ga organizam ne može sintetizirati pa se mora unositi hranom. Njegova uloga u organizmu je velika jer je ključan za funkcioniranje mnogih enzima u tijelu, neophodan je u sintezi kolagena, u radu

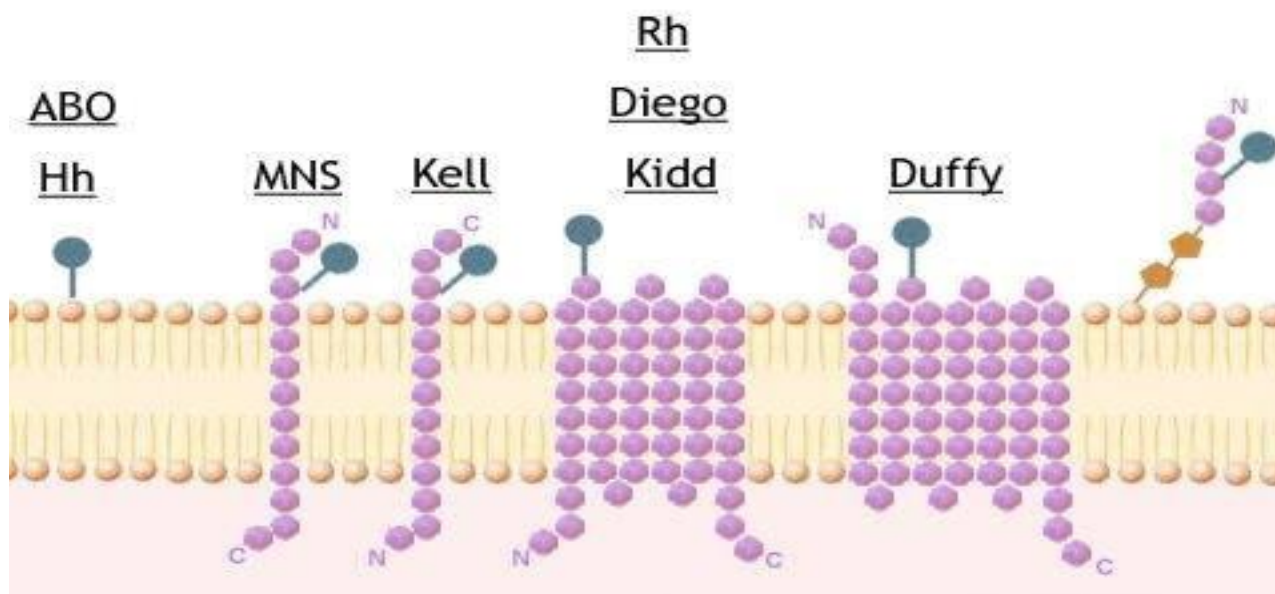
imunološkog sustava, štiti od kardiovaskularnih bolesti i jedan je od najjačih antioksidansa u organizmu. Vitamin C sudjeluje u izgradnji hemoglobina i eritrocita te je poznato da poboljšava apsorpciju željeza i pomaže u pretvaranju folne kiseline u njezin aktivni oblik.

1.1.3. Građa eritrocita

Eritrociti su stanice diskoidnog bikonkavnog oblika, promjera 8 μm i debljine oko 2,2 μm . Sastoje se od membrane i citoplazme. Ne sadrže jezgru čime je zadovoljen maksimalni kapacitet prijenosa kisika. Osim jezgre eritrociti čovjeka ne sadrže endoplazmatski retikulum a ni većinu ostalih staničnih struktura jer se u njima ne odvijaju složeni metabolički procesi niti mogu dijeliti. No, u citoplazmi eritrocita se ipak nalaze određeni enzimi pomoću kojih se može proizvoditi mala količina ATP-a iz glukoze. Metabolizmom glukoze koji se odvija u eritrocitima nastaju energijom bogati spojevi ATP koji je potreban za održavanje volumena eritrocita, njegova oblika i fleksibilnosti te NADH, NADPH i 2,3-DPG važni za redukciju hemoglobina, regulaciju afiniteta hemoglobina za kisik, održavanje eritrocitne membrane u aktivnom, reduciranom obliku te za održavanje hemoglobinskog željeza u funkcionalno aktivnom Fe^{2+} obliku.

Svaki je eritrocit obavijen membranom koju čini polupropusni fosfolipidni dvosloj u kojem se nalaze globularni proteini različitih veličina. Na vanjskom dijelu membrane smještene su molekule koje određuju antigensku strukturu eritrocita – krvne grupe. Čine ih zajednički naslijeđeni antigeni koji se tijekom života ne mijenjaju. Do danas je otkriveno više od 600 eritrocitnih antigena od kojih su 194 svrstana u 23 sustava krvnih grupa. Među njima su najvažniji eritrocitni AB0 antigeni i RhD antigeni jer su najteže nuspojave transfuzijskog liječenja uzrokovane upravo AB0 i Rh nepodudarnošću između bolesnikovog seruma i davateljevih eritrocita. **AB0 antigeni** se osim na eritrocitnoj membrani nalaze i na stanicama ostalih tkiva a nasljeđuju se prema Mendelovu zakonu s tim da su A i B geni kodominantni a gen 0 je recesivan. Sustav krvnih grupa AB0 obuhvaća 4 krvne grupe: A, B, AB i 0. One su definirane prisutnošću eritrocitnih antigena A i B. Eritrocitni antigeni se nazivaju i aglutinogenima, a protutijela protiv tih antigena nazivaju se aglutininima. Na eritrocitima krvne grupe A

nalazi se antigen A, na eritrocitima krvne grupe B antigen B, u krvne grupe AB postoje oba antigena dok eritrociti krvne grupe 0 nemaju ni jedan od ovih antigena. U serumu osoba krvne grupe A nalaze se protutijela protiv antigena B (anti-B), u krvne grupe B protutijela anti-A dok u serumu osoba krvne grupe AB nema protutijela, a krvna grupa 0 sadrži obje vrste protutijela.



Slika1. Sustavi eritrocitnih krvnih grupa

Druga važna skupina eritrocitnih antigena su **antigeni sustava Rh**. Među njima je najznačajniji RhD. RhD pozitivnom osobom smatra se ona koja ima na svojim eritrocitima antigen D. Osobe koje na svojim eritrocitima nemaju antigen D ne stvaraju prirodna anti-D protutijela kao što je to slučaj u AB0 sustavu krvnih grupa (3). Za razliku od protutijela sustava AB0, protutijela anti-RhD ne stvaraju se odmah nakon rođenja već kad Rh negativna osoba dođe u doticaj s Rh pozitivnom krvi. Transfuzija RhD pozitivne krvi RhD negativnom bolesniku izaziva stvaranje anti-D protutitijela pa će pri ponovnoj transfuziji RhD pozitivne krvi taj bolesnik imati neželjenu reakciju na transfuziju. Od ostalih eritrocitnih antigena najčešći su Lewis-sustav, P-sustav, Kell-sustav, Duffy-sustav, Kidd-sustav i MNS-sustav (Slika 1.).

Od anorganskih tvari u eritrocitu dominira voda i to oko 70 %. U vodi su otopljene mineralne soli a prevladavaju kloridi dok bikarbonata i fosfata ima manje. Sulfati su

prisutni samo u tragovima. **Kalij** je glavni kation unutarstanične tekućine svih stanica organizma pa tako i eritrocita. Zajedno s **natrijem**, koji je glavni kation izvanstanične tekućine, sudjeluje u održavanju membranskog potencijala, osmotskog tlaka te u regulaciji acido-bazne ravnoteže. Koncentracija kalija unutar stanica je 30x veća nego izvan stanica dok je koncentracija natrija 10x manja unutar stanice nego izvan nje. **Klor** je anion primarno uključen u regulaciju acido-bazne ravnoteže. Također je važan u održavanju membranskog potencijala stanica, konstantnog pH i osmotskog tlaka unutar stanica. pH eritrocita je kao i pH plazme i iznosi 7.2 - 7.4 (slabo alkalni medij). U eritrocitima se nalazi željezo.

Od ukupne mase eritrocita 34-39% otpada na organske tvari. Pored hemoglobina koji služi za vezivanje plinova prisutni su globulini, nukleoproteidi, glukoza, lecitin te razni vitamini, hormoni i enzimi. **AST** je enzim koji katalizira staničnu reakciju u kojoj iz aspartata i alfa-ketoglutarata nastaju oksalacetat i glutamat i obrnuto. Povišene vrijednosti AST-a u serumu mogu ukazivati na oštećenje organa u kojima se nalazi kao npr. bolesti jetre, srca ili eritrocita. **LDH** je citoplazmatski enzim prisutan u svim tkivima. Ovaj enzim ima pet izoenzima od kojih je svaki specifičan za pojedini organ. LD1 i LD2 su specifični za srce i eritrocite te su povišeni kod infarkta miokarda i hemolitičke anemije. Obzirom da je koncentracija LDH u tkivima i do 500x viša nego u plazmi oštećenje male količine tkiva (npr. eritrocita) može dovesti do značajnog povišenja aktivnosti u serumu.

Najvažniji sastojak eritrocita je **hemoglobin**, crveni pigment odgovoran za crvenu boju krvi. Sastoji se od boje hema koja sadrži željezo i od bjelancevine globina. Glavne su funkcije hemoglobina prijenos kisika i ugljikovog dioksida te regulacija acidobazne ravnoteže. Svaka molekula hemoglobina sadrži četiri globinske jedinice a svaka od njih sadrži po jednu molekulu hema na koju se veže molekula kisika. Svaka molekula hema sadrži željezo koje reverzibilno veže po jednu molekulu kisika pa tako jedna molekula hemoglobina može vezati četiri molekule kisika. Glavni je hemoglobin odrasla čovjeka hemoglobin A, podjediničnoga sastava $\alpha_2\beta_2$, gdje α i β označavaju različite podjedinice.(1)

Razgradnjom hemoglobina koja se odvija uglavnom u stanicama mononuklearno – makrofagnog sustava oslobađa se željezo natrag u krv gdje se ponovo iskorištava za

sintezu hema i hemoglobina ili se u obliku feritina skladišti. Ostatak molekule se kroz različite faze pretvara u bilirubin koji se otpušta u krv i jetrom izlučuje u žuč.

1.1.4. Osobine eritrocita

Laboratorijsko određivanje kompletne krvne slike rutinska je hematološka pretraga. Ona uključuje brzo i pouzdano dobivanje podataka koji pomažu u dijagnosticiranju različitih poremećaja kod bolesnika te u praćenju terapije. Nove generacije automatskih hematoloških analizatora doprinijele su uštedi vremena i smanjenju troškova analize a ujedno donijele mogućnost temeljitog ispitivanja uzoraka. Za takvo automatizirano određivanje hematoloških parametara krvne slike krv se vadi iz kubitalne vene u epruvetu s dikalijevom soli EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) kao antikoagulansom. U tu svrhu se koristi sustav epruveta s vakumom koji osigurava pravilan omjer krvi i antikoagulansa. Ovisno o vrsti hematološkog analizatora iz jednog uzorka tako izvađene krvi mogu se izraditi analize vrste, broja, odnosa i izgleda staničnih elemenata krvi (krvna slika, hematološki parametri) kao što su:

- broj eritrocita, Erc - snižene vrijednosti su najčešće znak anemije ili gubitka krvi uslijed krvarenja a povišene se mogu javiti u stanjima hemokoncentracije ili kod policitemije
- koncentracija hemoglobina, Hb - vrijednosti su snižene kod anemija a povišene u stanjima hemokoncentracije ili kod policitemije
- hematokrit, Hct - volumen eritrocita u jedinici pune krvi snižen je kod anemija, leukemija, hipertireoze, ciroze jetre, opeklina, infekcija, u trudnoći a smanjuje se i s godinama života; povišene vrijednosti hematokrita javljaju se kod dehidracije i šoka
- eritrocitne konstante, MCV, MCH i MCHC - izračunavaju se iz broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i hematokrita, daju informacije o kvaliteti eritrocita i korisne su u morfološkoj klasifikaciji anemija:
 - MCV (engl. *mean corpuscular volume*) - prosječni volumen jednog eritrocita daje informaciju o veličini eritrocita: - normociti (80 – 100 fL)
 - mikrociti (< 80 fL)
 - makrociti (> 100 fL)

- MCH (engl. *mean corpuscular hemoglobin*) - prosječan sadržaj hemoglobina u jednom eritrocitu; manji eritrociti sadrže manje hemoglobina a veći više
- MCHC (engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration*) - prosječna koncentracija hemoglobina u 1L eritrocita; daje informaciju o normokromnoj, hipokromnoj ili hiperkromnoj populaciji eritrocita
- RDW (engl. *red cell distribution width*) - mjera varijabilnosti veličine eritrocita, izračunati indeks koji ukazuje na postojanje jedne ili više populacija eritrocita i pomaže u otkrivanju anizocitoze; povišena vrijednost je prognostički pokazatelj djelotvornosti liječenja deficitarnih anemija
- broj retikulocita, Rtc - broj nezrelih eritrocita s ostacima RNK koji označava stupanj aktivnosti koštane srži važan u patofiziološkoj klasifikaciji anemija
- broj leukocita, L - stanice koje štite organizam od infekcije i sudjeluju u imunom odgovoru
- diferencijalna krvna slika, DKS - postotak pojedinih vrsta leukocita u ukupnom broju leukocita poremećen je u brojnim patološkim stanjima
- broj trombocita, Trc - stanice važne u procesu zgrušavanja krvi

Tablica 1. Referentne vrijednosti kompletne krvne slike

Eritrociti	Ž 3,86 – 5,08 x 10 ¹² /L M 4,34 – 5,72 x 10 ¹² /L
Hemoglobin	Ž 119 – 157 g/L M 138 – 175 g/L
Hematokrit	Ž 0,356 – 0,470 L/L M 0,415 – 0,530 L/L
MCV	83,0 – 97,2 fl
MCH	27,4 – 33,9 fL
MCHC	320 – 345 g x10 ⁹ /L
RDW	9,0 – 13,8 %
Trombociti	158 – 424 x 10 ⁹ /L
Leukociti	Ž 3,3 - 9,3 x10 ⁹ /L M 3,5 – 10,0 x 10 ⁹ /L

Kompletna krvna slika pruža vrijedne informacije o vrstama, broju i kvaliteti stanica u krvi i neophodna je pri procjeni općeg zdravstvenog stanja i otkrivanja različitih zdravstvenih poremećaja poput anemija, infekcija, virusnih bolesti itd. Referentne vrijednosti kompletne krvne slike prikazane su u tablici 1. Osobine eritrocita koje možemo iščitati iz nalaza kompletne krvne slike predstavljaju prvi korak u pomoći kliničaru da donese odluku o transfuzijskom liječenju koncentratima eritrocita.

1.2. Anemije

Anemije su stanja smanjene sposobnosti krvi da prenosi kisik zbog smanjene količine hemoglobina (5). Najčešće se dijele prema mehanizmu nastanka (kinetički pristup) i prema veličini srednjeg volumena eritrocita, MCV (morfološki pristup). Podjela anemija prema mehanizmu nastanka prikazana je u tablici 2 a prema morfologiji u tablici 3.

Tablica 2. Anemije prema mehanizmu nastanka

Poremećeno stvaranje eritrocita	<i>Hipoproliferacijske anemije</i>	oštećenje koštane srži	zračenje, fibroza, tumor, upala
		smanjena stimulacija	bolesti bubrega
	<i>Anemije zbog poremećaja u sazrijevanju</i>	poremećaj jezgre	manjak vitamina B ₁₂ i folne kiseline
		citoplazmatski poremećaj	manjak željeza
Ubrzano propadanje eritrocita	<i>Hemolitičke anemije</i>	intravaskularna hemoliza	endotoksin, lijekovi, toplina
		ekstravaskularna hemoliza	autoimune enzimopatije, membranopatije
Povećani gubitak eritrocita	<i>Krvarenje</i>	akutno	akutna hemoragijska anemija
		kronično	manjak željeza

Tablica 3. Anemije prema veličini eritrocita

Mikrocitne anemije <i>MCV < 80 fL</i>	Normocitne anemije <i>MCV 80 - 100 fL</i>	Makrocitne anemije <i>MCV > 100 fL</i>
sideropenična anemija talasemija anemija kronične bolesti sideroblastična anemija	akutno krvarenje sideropenična anemija anemija kronične bolesti supresija koštane srži aplastična anemija kronično zatajenje bubrega	deficit folne kiseline deficit vitamina B ₁₂ hemolitička anemija lijekovima uzrokovana anemija

Obzirom da je prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije anemija određena koncentracijom hemoglobina, kod muškaraca anemija nastupa ako razina hemoglobina padne ispod 130 g/L a kod žena je to ispod 120 g/L.

Transfuzijsko liječenje je preduvjet mnogih medicinskih zahvata u liječenju i spašavanju života, ono se, osim u anemijama, primjenjuje i kod krvarenja, operacija na srcu i velikim krvnim žilama, kod zloćudnih bolesti, presađivanja organa, presađivanja koštane srži, opekline te u liječenju novorođenčadi.

1.3. Krvni pripravci

Krvni pripravak je krv ili krvni sastojak pripremljen za transfuzijsko liječenje bolesnika.

Da bi nastao krvni pripravak nužno je:

- prikupiti krv od DDK
- testirati krv
- proizvesti krvni pripravak
- čuvati krvni pripravak

1.3.1. Prikupljanje krvi za proizvodnju krvnih pripravaka

Za proizvodnju krvnih pripravaka krv se prikuplja od dobrovoljnih darivatelja krvi.

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije i Međunarodnog Crvenog križa dobrovoljni darivatelj krvi je osoba koja svojom slobodnom voljom daje krv, plazmu ili pojedine stanične dijelove krvi i za to ne prima nikakvu novčanu niti drugu naknadu. Plemeniti i humani cilj dobrovoljnih darivatelja krvi temelj je suvremenih metoda medicinskog liječenja krvnim pripravcima. Dobrovoljni darivatelji krvi su jedini izvor tog dragocjenog lijeka kojega još uvijek nije moguće proizvesti na umjetan način. Darivanje krvi ne šteti zdravlju, štoviše, dobrovoljnim darivanjem krvi ne samo da se pomaže drugima nego se i kontrolira vlastito zdravlje. Krv mogu dati sve zdrave osobe od 18 do 70 godina života koje je pregledao liječnik i na osnovu fizikalnog pregleda i anamnestičkih podataka zaključio da je osoba dobrog općeg zdravstvenog stanja. Osim toga, radi zaštite zdravlja svakog darivatelja krvi posebno je važno da budu zadovoljeni svi kriteriji za odabir dobrovoljnih darivatelja krvi, a to su:

- tjelesna težina iznad 55 kg, proporcionalno visini
- tjelesna temperatura do 37°C
- sistolički krvni tlak 90 – 180 mmHg, dijastolički krvni tlak 60 – 110 mmHg
- puls 50 – 110 otkucaja u minuti
- koncentracija hemoglobina kod muškaraca najmanje 135 g/L a kod žena najmanje 125 g/L

Darivanje krvi traje 8 - 12 minuta i ne šteti zdravlju jer zdrav organizam darivatelja brzo nadoknadi količinu i sve sastavne dijelove darovane krvi. Unutar 24 sata nadoknadi se plazma i njeni sastojci, broj trombocita i broj leukocita. Za 4 - 6 tjedana nadoknade se eritrociti a gubitak željeza se nadoknadi u roku 1 do 2 mjeseca pojačanom apsorpcijom iz hrane. Najčešće se daruje jedna doza ili 450 ml pune krvi u sistem plastičnih vrećica s antikoagulansom i u toj dozi se nalaze svi krvni sastojci: eritrociti, plazma, leukociti i trombociti.

Darivatelj krvi u Republici Hrvatskoj mora biti državljanin Republike Hrvatske (6). Muškarci mogu darivati punu krv do četiri puta godišnje s razmakom između darivanja od tri mjeseca a žene do tri puta godišnje s razmakom od četiri mjeseca. Prije uzimanja krvi ili krvnog sastojka svakom se darivatelju mora objasniti rizik darivanja, postupak uzimanja i ispitivanja koja će se izvesti na njegovom uzorku a treba ga i upoznati s načinima zaraze HIV—om kako bi osoba rizičnog ponašanja mogla odustati od darivanja. Isto tako, prije svakog davanja krvi ili krvnog sastojka osoba koja pristupa davanju mora dati suglasnost za dobrovoljno davanje krvi ili krvnih sastojaka (7).

1.3.2. Testiranje krvi

Svaka doza darovane krvi obavezno se testira na:

- krvlju prenosive bolesti (tablica 4.)
- određuje se AB0 i RhD krvna grupa te prisustvo iregularnih antieritrocitnih protutijela

Tablica 4. *Krvlju prenosive bolesti i uzročnici*

bolest	uzročnik
hepatitis B	virus hepatitisa B
hepatitis C	virus hepatitisa C
AIDS	virus HIV
sifilis	bakterija <i>Treponema pallidum</i>

1.3.3. Proizvodnja krvnih pripravaka

Krvni pripravci se proizvode uzimanjem krvi u sustav višestrukih plastičnih vrećica, centrifugiranjem, filtracijom i razdvajanjem sastojaka. Krv se centrifugira da bi se na principu različitih specifičnih gustoća njenih sastavnih dijelova razdvojila na svoje osnovne elemente: eritrocite, leukocite, trombocite i plazmu. Na dnu ostaju eritrociti, iznad njih leukociti i trombociti, a na vrhu ostaje plazma. To je ujedno temeljni princip razdvajanja sastavnih dijelova pune krvi i njihovog prebacivanja u dodatne vrećice **pritiskom izvana** te tako nastaju primarni krvni pripravci: koncentrat eritrocita, sloj trombocita i leukocita i plazme. Jedna doza krvi ili krvnoga pripravka u pravilu predstavlja dozu jednoga darivatelja.

DDK može darovati samo jedan ili više raznih krvnih sastojaka koji se u tom slučaju uzimaju pomoću staničnog separatora u koji je uložen plastični set za odvajanje krvnog sastojka (**afereza**). Krv iz jedne vene ulazi kroz plastičnu cijev u plastični set uložen u centrifugu staničnog separatora. Centrifugiranjem se izdvaja sastojak krvi, a ostali dio se vraća u darivateljevu venu na istoj ili na drugoj ruci. Na taj se način može uzeti više doza od jednog pacijenta.

Od krvi jednog darivatelja može proizvesti i mali broj različitih pripravaka razdvajanjem na više manjih pripravaka nakon što je završio postupak laboratorijskoga ispitivanja. Time je omogućeno liječenje istoga bolesnika, najčešće novorođenčadi i djece, pripravkom od samo jednoga davatelja. No, ponekad se pripravak proizvodi od krvi više darivatelja. Proizvodnja novoga krvnog pripravka od više gotovih pripravaka različitih davatelja najčešće se koristi za spajanje više trombocitnih pripravaka. Sekundarni krvni pripravci proizvode se od gotovih primarnih krvnih pripravaka na više načina: filtracijom, pranjem, zračenjem.

Proizvodnja **filtracijom** provodi se izdvajanjem leukocita iz krvnih pripravaka pomoću filtera izrađenih od poliesterskih niti ili poliuretana. Oni omogućuju redukciju leukocita za više od 99%.

Pranje krvnih pripravaka je postupak koji zahtijeva pranje u fiziološkoj otopini tri do šest puta. Pranjem krvnih pripravaka smanjuje se udio bjelančevina u pripravku čime značajno pada učestalost alergijskih reakcija. Stoga su ovi pripravci namijenjeni

bolesnicima koji su na nekadašnje transfuzije pripravaka krvi reagirali alergijskim ili anafilaktičkim reakcijama. **Zračenje** krvnih pripravaka provodi se pomoću gamma zračenja i tako se smanjuje rizik od reakcije transplantata protiv primatelja. Primjerena doza zračenja je od 25 do 30 Gy.

Koncentracija aktivnih sastojaka u sekundarnim krvnim pripravcima povećava se dok je koncentracija štetnih sastojaka u njima manja. Na taj se način krvnom pripravku povećava učinkovitost a rizik od nuspojava nakon transfuzije takvog pripravka je smanjen. Ipak, bakterijska je kontaminacija sekundarnih krvnih pripravaka češća zbog mogućeg kontakta pripravka sa zrakom (filtriranje, pranje).

U proizvodnji krvnih pripravaka koriste se antikoagulansi na bazi citrata. Najčešća je CPDA-1 (citat, fosfat, dekstroza, adenin) antikoagulantna otopina koja je sadržana u donacijskim vrećicama i omogućuje najdulji rok trajanja pripravka do 35 dana.

Obzirom na svoj sastav CPDA-1 omogućava očuvanje vijabilnosti stanica, sprječava zgrušavanje krvi i razmnožavanje bakterija, usporava glikolizu i hidrolizu te optimizira pH.

Proizvodnja svih krvnih pripravaka mora biti u skladu sa zakonskim propisima i stručnim standardima. Zato treba provoditi kontrolu postupka proizvodnje koja će biti garancija da je dobiveni proizvod tražene kvalitete. Prema preporukama Vijeća Europe treba kontrolirati 1% gotovih pripravaka odnosno 4 do 10 pripravaka mjesečno kad ih ustanova proizvodi mali broj (2).

1.3.4. Čuvanje krvnih pripravaka

Krvni pripravci čuvaju se na temperaturi optimalnoj za njihovo čuvanje (tablica 5.).

Tablica 5. *Temperatura i rok skladištenja krvnih pripravaka*

uzorak	temperatura	vrijeme skladištenja
Koncentrati eritrocita	2 - 6°C	do 35 dana
Koncentrati trombocita	20 - 24°C	u posebnom inkubatoru do 5 dana uz stalno miješanje
Koncentrati leukocita	20 - 24°C	24 sata
Svježe smrznuta plazma	< -30°C	do 2 godine

Proizvedeni krvni pripravci se skladište na odgovarajućim temperaturama u odvojenim hladnjacima koji moraju imati ventilator, sustav za praćenje temperature, priključak na rezervni izvor energije te alarmni sustav a njihovu ispravnost treba redovito kontrolirati.

1.3.5. Koncentrati eritrocita

Eritrocitni pripravci najznačajniji su proizvod u transfuzijskoj djelatnosti i temelj su transfuzijskog liječenja. Najčešće se primjenjuju u liječenju anemija, kirurških i životno ugroženih bolesnika. Koncentrati eritrocita sadrže eritrocite i hemoglobin koji opskrbljuje tkiva kisikom. Zato su njihova glavna obilježja duljina života transfudiranih eritrocita i kapacitet prijenosa kisika.

Indikacije za transfuzije koncentrata eritrocita su:

- krvarenje s gubitkom više od 25% cirkulacijskog volumena
- Hb < 80 g/l preoperativno
- Hb < 110 g/l i značajna kardiopulmonalna insuficijencija
- Hb < 70 g/l u kroničnoj anemiji
- Hb < 80 g/l u insuficijenciji koštane srži

Jedna doza koncentrata eritrocita može dovesti do povećanja hemoglobina za 10 g/L i povećanja hematokrita za 3% kod odraslog stabilnog bolesnika koji ne krvari a jedan eritrocitni pripravak može nadoknaditi gubitak krvi od 500 ml.

Krv od koje će se proizvoditi eritrocitni pripravci najčešće se uzima u sistem donacijskih vrećica s CPDA-1 antikoagulantnom otopinom i nakon odvajanja ostalih komponenti eritrociti se uglavnom skladište u hranjivoj otopini SAGM (sukroza, adenin, glukoza, manitol). Ove otopine omogućuju produženje roka uporabe pripravka te bolje održavanje njegove kvalitete. Naime, dodatkom adenina u hranjive otopine bolje se održava koncentracija 2,3-difosfoglicerata u eritrocitima čime je očuvana i dostatna oksigenacija tkiva. No, na održavanje koncentracije ATP-a u eritrocitima ne može se utjecati antikoagulantnim ili hranjivim otopinama. Obzirom da je ATP energijom bogati spoj značajan za život eritrocita, zbog sniženog ATP-a skraćen je i život eritrocita u svim eritrocitnim pripravcima.

Ovisno o načinu proizvodnje eritrocitni pripravci mogu biti pripremljeni kao konzervirana krv („puna“ krv), deplazmatizirani eritrociti, oprani eritrociti, eritrociti sa

smanjenim brojem leukocita, eritrociti bez trombocitno – leukocitnog sloja, smrznuti eritrociti, ozračeni eritrociti te pripravak eritrocita krvne grupe 0 u plazmi krvne grupe AB.

Puna krv je ishodište za proizvodnju svih ostalih krvnih pripravaka. U njoj ništa nije promijenjeno ili oduzeto od davateljeve krvi a dobiva se miješanjem krvi davatelja s antikoagulantnom otopinom u omjeru 1:8. Obzirom da se u punoj krvi nalaze eritrociti, proteini plazme i svi faktori zgrušavanja osim faktora V i VIII indikacija za transfuziju ovog pripravka je istodobna potreba za nadoknadom volumena krvi, eritrocita i proteina.

Deplazmatizirani tj. koncentrirani eritrociti nastaju odvajanjem većeg dijela plazme bogate trombocitima te sadrže oko 200 mL eritrocita, do 50 mL plazme i antikoagulantnu otopinu. Ovisno o antikoagulantnim i hranjivim otopinama upotrebljivost doze koja se čuva na +4°C dostiže 35 dana. Količina hemoglobina u ovom pripravku mora biti veća od 45 g/L a zadnjeg dana skladištenja ne smije biti hemolizirano više od 0,8% eritrocita. Pripravci se čuvaju na temperaturi 2 do 6°C a trajanje transporta najdulje iznosi 24 sata na temperaturi manjoj od 10°C. Kada se eritrociti ugriju moraju se transfudirati u roku od 4 sata.

Ostale vrste eritrocitnih pripravaka ubrajaju se u sekundarne eritrocitne pripravke.

Pripravak opranih eritrocita nastaje njihovim višestrukim pranjem tijekom čega se odstranjuje većina trombocita, leukocita i proteina plazme. Ovaj pripravak može biti nadomješten **eritrocitnim pripravkom bez trombocitno – leukocitnog sloja** koji nastaje centrifugiranjem i izdvajanjem tog sloja i većeg dijela plazme.

Eritrocitni pripravak sa smanjenim brojem leukocita proizvodi se već opisanim procesom filtracije pri čemu u takvom koncentratu eritrocita ostaje svega 1×10^6 leukocita. Time se postiže značajno manja mikroagregacija stanica tijekom skladištenja i smanjenje febrilnih reakcija u primatelja. Također, ovakvi pripravci su nezamjenjivi u prevenciji imunizacije primatelja na HLA antigene, alergijskih reakcija ili prijenosa citomegalovirusne infekcije.

Pripravak smrznutih eritrocita proizvodi se odvajanjem eritrocita od plazme i njihovim smrzavanjem uz dodatak krioprotektivnih otopina. Takvi se pripravci mogu neograničeno čuvati na niskim temperaturama (i do 10 godina na - 65°C), a koriste se za liječenje pacijenata s rijetkim antigenima i protutijelima. U Hrvatskoj se ovakvi

pripravci ne proizvode ali postoji mogućnost njihove nabave iz Banke smrznutih pripravaka Vijeća Europe u Amsterdamu.

Koncentrati eritrocita krvne grupe „0“ jednog davatelja i svježe smrznuta plazma krvne grupe „AB“ drugog davatelja se još nazivaju **peta krvna grupa**. Ovaj pripravak se koristi za liječenje novorođenčadi s ABO imunizacijom ili anti-D iregularnim protutijelima.

U proizvodnji i čuvanju eritrocitnih pripravaka najvažnije je postići što kvalitetniji krvni pripravak kako bi transfuzijsko liječenje pacijenata bilo učinkovito i sigurno, a posttransfuzijske reakcije i druge komplikacije kod pacijenata bile minimalizirane.

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada je utvrditi hematološke i biokemijske promjene koje nastaju tijekom čuvanja koncentrata eritrocita u optimalnim uvjetima. U tu svrhu ćemo u koncentratima eritrocita u prvom i zadnjem danu skladištenja ispitati:

1. hematološke pokazatelje: eritrocite, hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH i MCHC
2. biokemijske pokazatelje: Na, K, Cl, AST, LDH, pH

3. MATERIJALI I METODE

Prikupljeno je 450 ml krvi od DDK. Krv je prikupljena u četverostruke donacijske vrećice proizvođača „MacoPharma“ s ACD antikoagulantnom otopinom. Vrećice su potom centrifugirane, nakon centrifugiranja odvojeni su:

- koncentrat eritrocita
- sloj leukocita i trombocita
- plazma

U koncentrate eritrocita se dodalo 100 ml SAG-M hranjive otopine nakon čega je pripravak filtriran. Filtracija je izvršena unutar 24 sata od uzimanja krvi pomoću leukocitnog filtera. Postupak filtracije je trebao zadržati više od 99,9% leukocita. Filtriranje se provodi prema radnoj uputi sukladno kojoj je potrebno provesti sve propisane radnje:

- odabir standardnog koncentrata eritrocita
- odabir i obilježavanje vrećice filtera
- filtriranje eritrocitnog koncentrata
- zatvaranje vrećica
- završna kontrola

Od svakog tako pripremljenog koncentrata eritrocita uzorkovano je dva puta po 15 ml za hematološke i biokemijske analize. U prvih 15 ml analize su učinjene odmah, prvi dan čuvanja. Drugih 15 ml je pohranjeno u vrećicama na odgovarajuću temperaturu skladištenja (4°C/35 dana) za hematološke i biokemijske analize koje će se učiniti na dan isteka roka valjanosti koncentratima eritrocita.

U deset proizvedenih koncentrata, prvi i zadnji dan čuvanja analizirani su hematološki parametri:

- broj eritrocita
- hemoglobin
- hematokrit
- eritrocitne konstante MCV, MCH i MCHC

Ispitivanje hematoloških parametara izvršeno je na potpuno automatiziranom hematološkom brojaču Siemens Advia 2012i. Za analizu je korišten uzorak pune krvi.

U deset istih koncentrata analizirani su prvi i zadnji dan čuvanja biokemijski parametri:

- elektroliti (natrij, kalij i klor)
- AST
- LDH

Biokemijski parametri su ispitani na biokemijskom analizatoru Beckman Coulter AU680. Uzorci za analizu su prethodno obrađeni centrifugiranjem na 3500 okretaja/10 minuta te su iz izdvojene plazme određeni željeni analiti.

pH je izmjeren na Rapidlab 1265 sistemu namijenjenom za određivanje plinova, elektrolita, metabolita i CO-oximetrije u uzorcima arterijske, venske i kapilarne krvi. Sva su ispitivanja izvedena na Odjelu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC Split.

Statistička analiza

Statistička obrada podataka učinjena je programskom podrškom Microsoft Excel 2007. Svaki ispitani parametar statistički je zasebno obrađen (prvi i zadnji dan skladištenja). Izračunata je aritmetička sredina kao mjera srednje vrijednosti ispitivane varijable te standardna devijacija kao mjera odstupanja koja govori o tome koliko podaci variraju oko prikazane mjere srednje vrijednosti (8). Podatci su prikazani tabelarno i grafički.

4. REZULTATI

Obrađeno je deset koncentrata eritrocita prvog i zadnjeg dana čuvanja. Analizirani su hematološki i biokemijski pokazatelji i uočeno je da su tijekom čuvanja koncentrata eritrocita nastale promjene u krvnim pripravcima.

U tablici 6. prikazani su rezultati analize eritrocita, hemoglobina i hematokrita koji ne ukazuju na znakovitu razliku u broju eritrocita i koncentraciji hemoglobina tijekom čuvanja koncentrata. Stoga se može zaključiti da nije došlo do hemolize tijekom čuvanja. S druge strane se može uočiti blagi porast vrijednosti hematokrita u pripravcima 35. dana njihovog skladištenja, kao posljedica većeg volumena eritrocita zadnji dan čuvanja .

Slike 3., 4., i 5. grafički pregledno prikazuju promjene broja eritrocita, hemoglobina i hematokrita u koncentratima eritrocita prvog i zadnjeg dana čuvanja.

Kod eritrocitnih konstanti uočen je porast MCV-a i pad MCHC-a dok je vrijednost MCH ista 35. dana čuvanja koncentrata eritrocita kao i na dan proizvodnje pripravaka. Veći volumen eritrocita posljedica je povećane popustljivosti eritrocitne membrane i promijenjenih uvjeta u hranjivom mediju u kojem se čuvaju zbog čega voda ulazi u eritrocite i mijenja njihov volumen. Sniženi MCHC ukazuje na nižu koncentraciju hemoglobina u litri eritrocita dok nepromijenjeni MCH govori o jednakoj količini hemoglobina u pojedinom eritrocitu kako na početku tako i na kraju čuvanja pripravaka. Rezultati mjerenja eritrocitnih konstanti prikazani su tablici 7. a slike 6., 7. i 8. predstavljaju grafički pregled promjene eritrocitnih konstanti u koncentratima eritrocita prvog i zadnjeg dana skladištenja.

Od biokemijskih parametara koji su ispitivani LDH pokazuje izrazito povećanje koncentracije 35. dana čuvanja pripravaka, porastao je prosječno za 893 U/L. Koncentracija AST je malo povećana, prosječno za 14 U/L. pH svakog koncentrata eritrocita je nakon 35 dana čuvanja pripravka niži i to u prosjeku za 0.782. Obzirom da se radi o citoplazmatskim enzimima za zaključiti je da im je aktivnost povišena zbog izlaska iz oštećenih i propalih stanica pripravka. Iz tih stanica izlaze i brojni metabolički produkti koji utječu na sniženje pH pripravka. Ovi su podatci prikazani u tablici 8. Slike

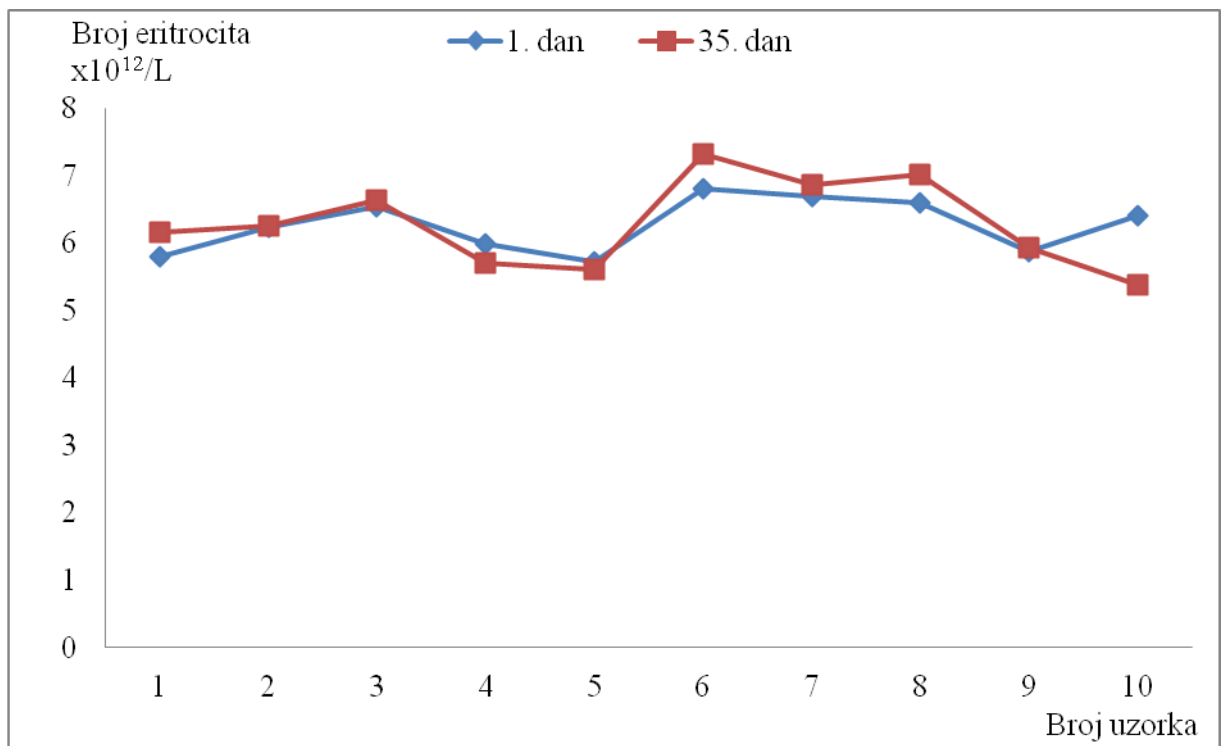
9., 10. i 11. grafički prikazuju promjene LDH, AST-a i pH u koncentratima eritrocita prvog i zadnjeg dana skladištenja.

Koncentracije Na i Cl su niže na dan isteka roka valjanosti pripravaka nego na dan njihove proizvodnje a koncentracija K je izrazito povišena. Kalij je porastao čak 10 puta. Razlog tome je inaktivnost Na/K pumpe na 4°C zbog čega dolazi do priljeva Na i Cl u stanice te do izlaska K iz njih. Pregledan prikaz rezultata mjerenja elektrolita u koncentratima eritrocita vidljiv je u tablici 9., a slike 12., 13. i 14. su grafički prikaz promjena koncentracija elektrolita u koncentratima eritrocita prvog i zadnjeg dana čuvanja.

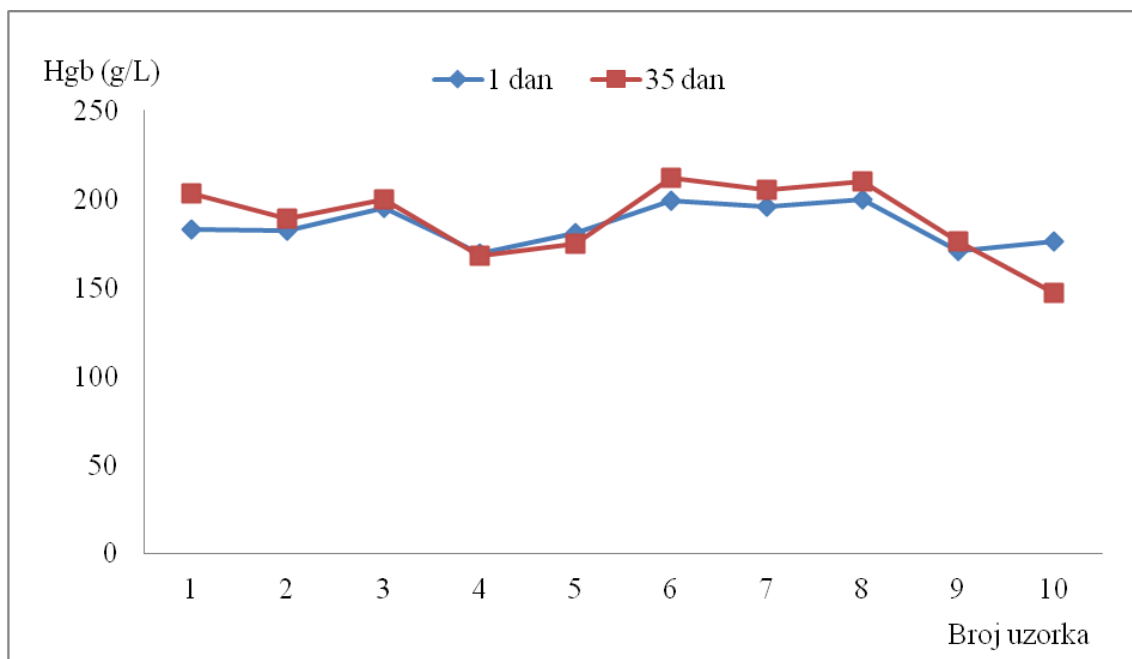
Tablica 6. *Promjene hematoloških parametara koncentrata eritrocita prvog i zadnjeg dana čuvanja*

<i>Broj uzorka</i>	Eritrociti (x10¹²/L)		Hemoglobin (g/l)		Hematokrit (L/L)	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.
1	5.79	6.15	183	203	0.57	0.65
2	6.23	6.26	182	189	0.56	0.60
3	6.53	6.64	195	200	0.61	0.67
4	5.99	5.69	169	168	0.55	0.57
5	5.72	5.60	181	175	0.56	0.58
6	6.80	7.31	199	212	0.58	0.68
7	6.69	6.85	196	205	0.59	0.66
8	6.60	7.01	200	210	0.60	0.71
9	5.87	5.92	171	176	0.55	0.60
10	6.40	5.37	176	147	0.55	0.49
<i>Prosjek ±SD</i>	6.26 ±0.398	6.28 ±0.65	185.2 ±11.56	188.5 ±21.37	0.57 ±0.022	0.62 ±0.065

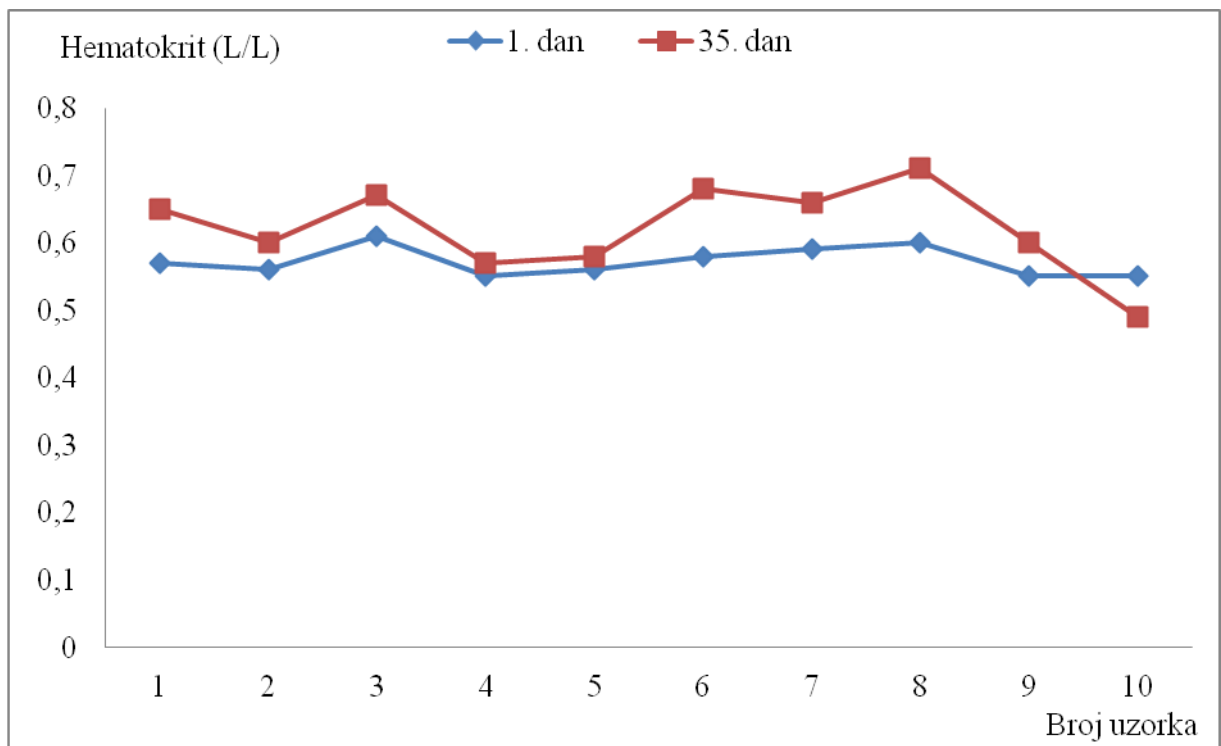
1. mjerenje prvog dana čuvanja pripravaka
2. mjerenje 35. dana čuvanja pripravaka



Slika 3 . Prikaz broja eritrocita u 10 koncentrata eritrocita 1. i 35. dana čuvanja.



Slika 4: Prikaz koncentracije hemoglobina u 10 koncentrata eritrocita 1. i 35. dana čuvanja



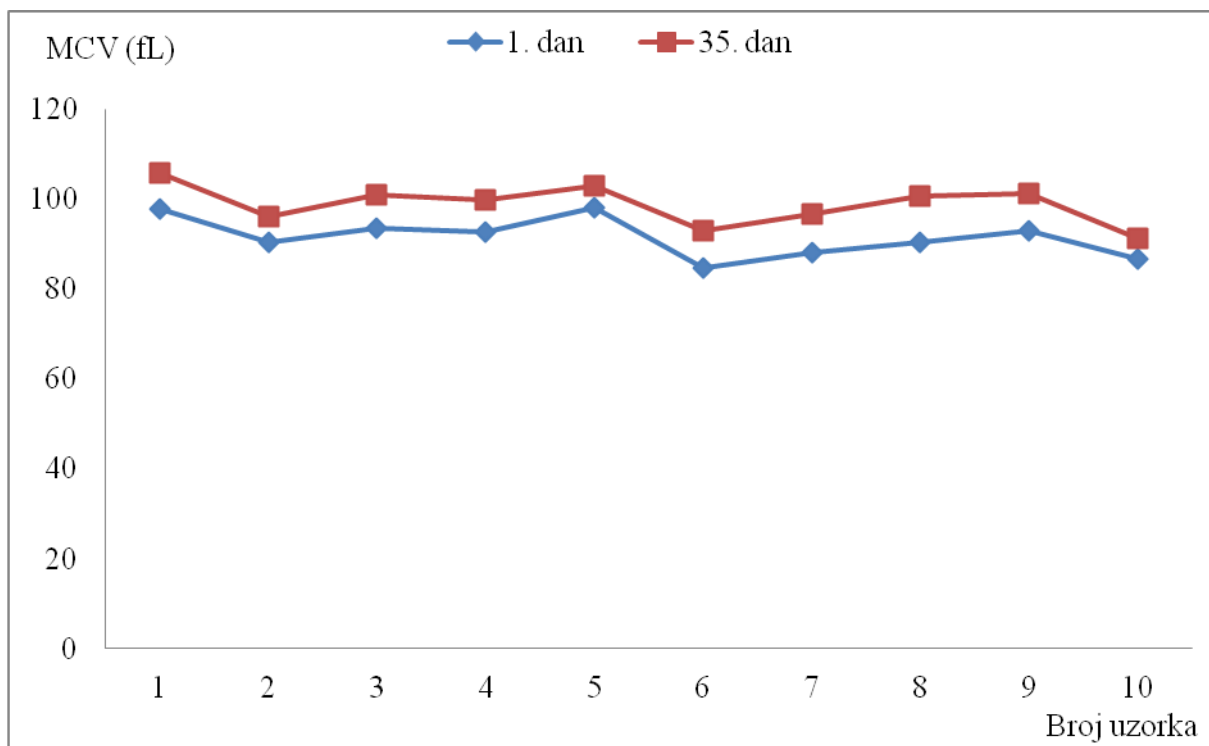
Slika 5: *Prikaz izmjerenog hematokrita u 10 koncentrata eritrocita 1. i 35. dana čuvanja*

Tablica 7. Promjene eritrocitnih konstanti koncentrata eritrocita prvog i zadnjeg dana čuvanja

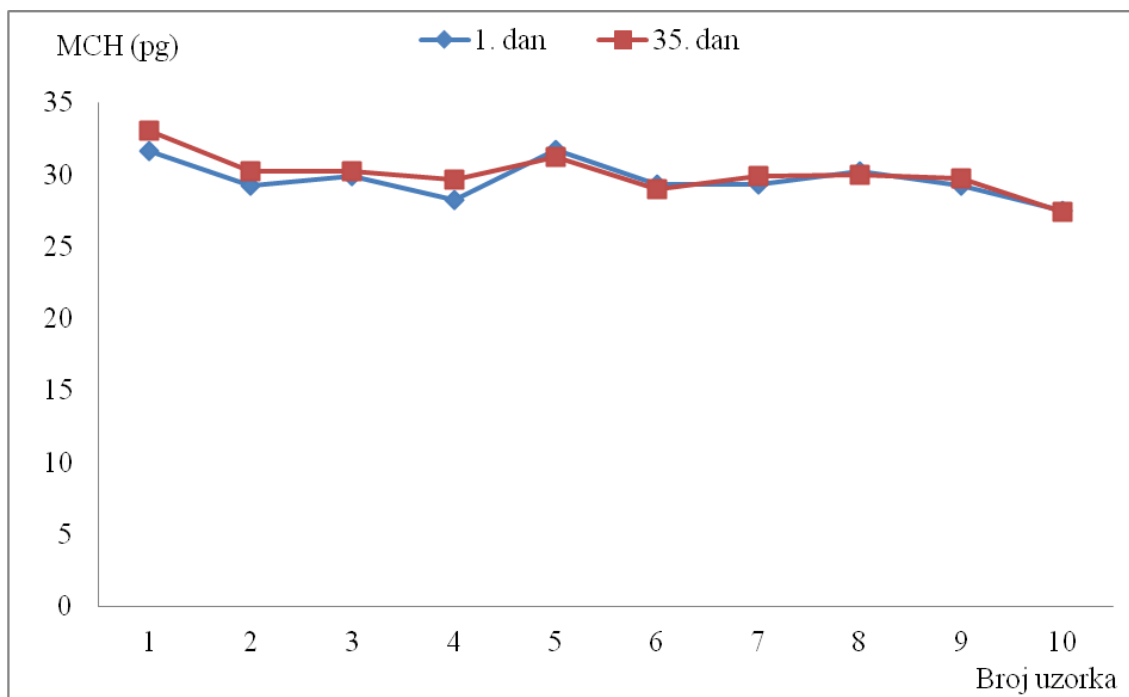
<i>Broj uzorka</i>	MCV (fL)		MCH (pg)		MCHC (g/L)	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.
1	97.7	105.8	31.6	33	323	311
2	90.2	96.0	29.2	30.2	324	315
3	93.5	100.8	29.9	30.2	319	299
4	92.5	99.7	28.2	29.6	304	297
5	97.9	103.0	31.7	31.2	323	303
6	84.6	93.0	29.3	29	346	312
7	88.1	96.5	29.3	29.9	333	310
8	90.3	100.7	30.2	30	335	298
9	93.0	101.1	29.2	29.7	314	294
10	86.6	91.1	27.5	27.4	317	300
<i>Prosjek</i>	91.44	98.77	29.61	30.02	323.8	303.9
<i>±SD</i>	±4.38	±4.55	±1.25	±1.36	±11.23	±7.05

1. mjerenje prvog dan čuvanja pripravaka

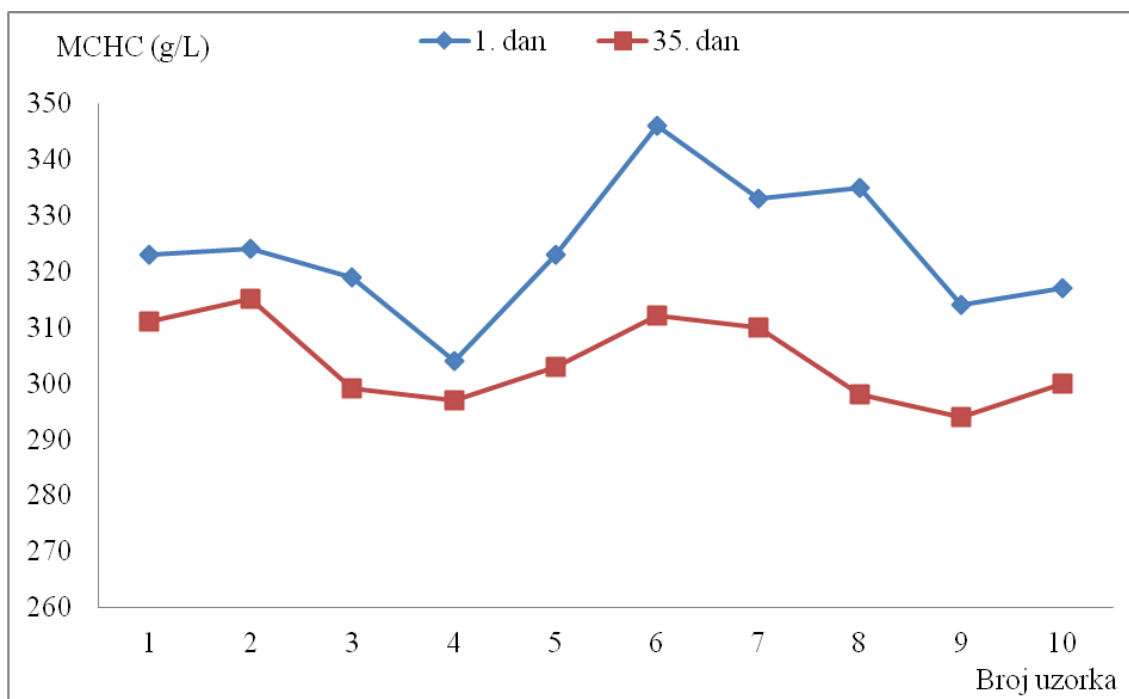
2. mjerenje 35. dana čuvanja pripravaka



Slika 6: Prikaz izmjerenog MCV-a u 10 koncentrata eritrocita 1. i 35. dana čuvanja



Slika 7: Prikaz izmjerenog MCH u 10 koncentrata eritrocita 1. i 35. dana čuvanja



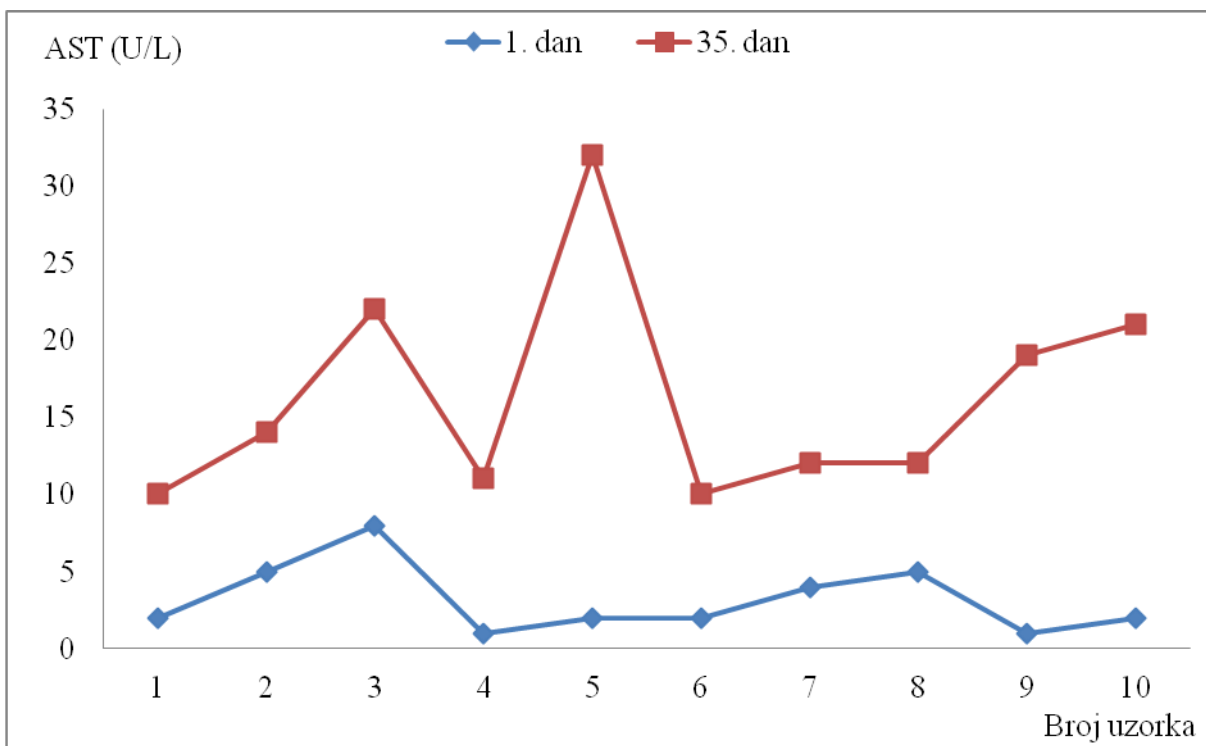
Slika 8: Prikaz izmjerenog MCHC u 10 koncentrata eritrocita 1. i 35. dana čuvanja

Tablica 8. Promjene AST-a, LDH i pHu koncentratima eritrocita prvog i zadnjeg dana čuvanja

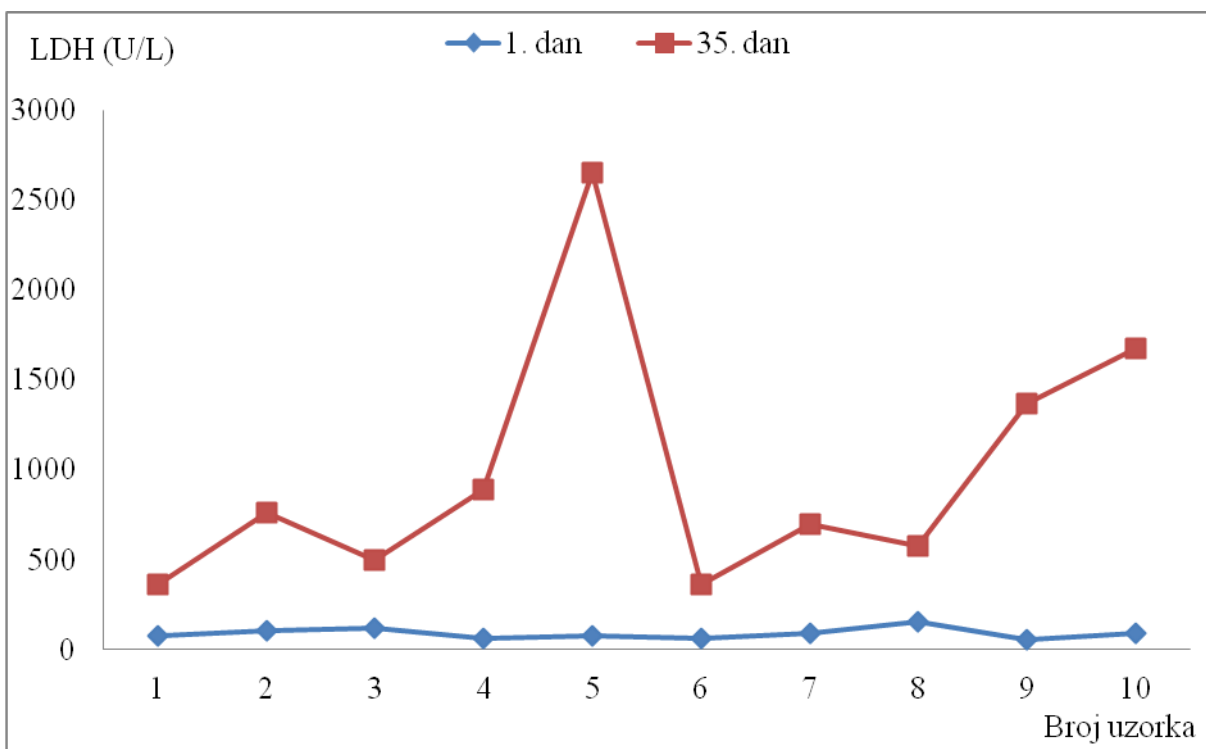
<i>Broj uzorka</i>	AST (U/L)		LDH (U/L)		pH	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.
1	2	10	73	358	7.2	6.4
2	5	14	104	763	7.183	6.438
3	8	22	122	496	7.174	6.398
4	1	11	65	889	7.188	6.389
5	2	32	75	2651	7.213	6.451
6	2	10	62	359	7.211	6.459
7	4	21	93	693	7.235	6.414
8	5	12	156	577	7.18	6.39
9	1	19	57	1364	7.224	6.426
10	2	21	88	1675	7.231	6.453
<i>Prosjek ±SD</i>	3.2 ±2.25	17.2 ±7.09	89.5 ±30.9	982.5 ±725	7.204 ±0.02	6.422 ±0.026

1. mjerenje prvog dana skladištenja pripravaka

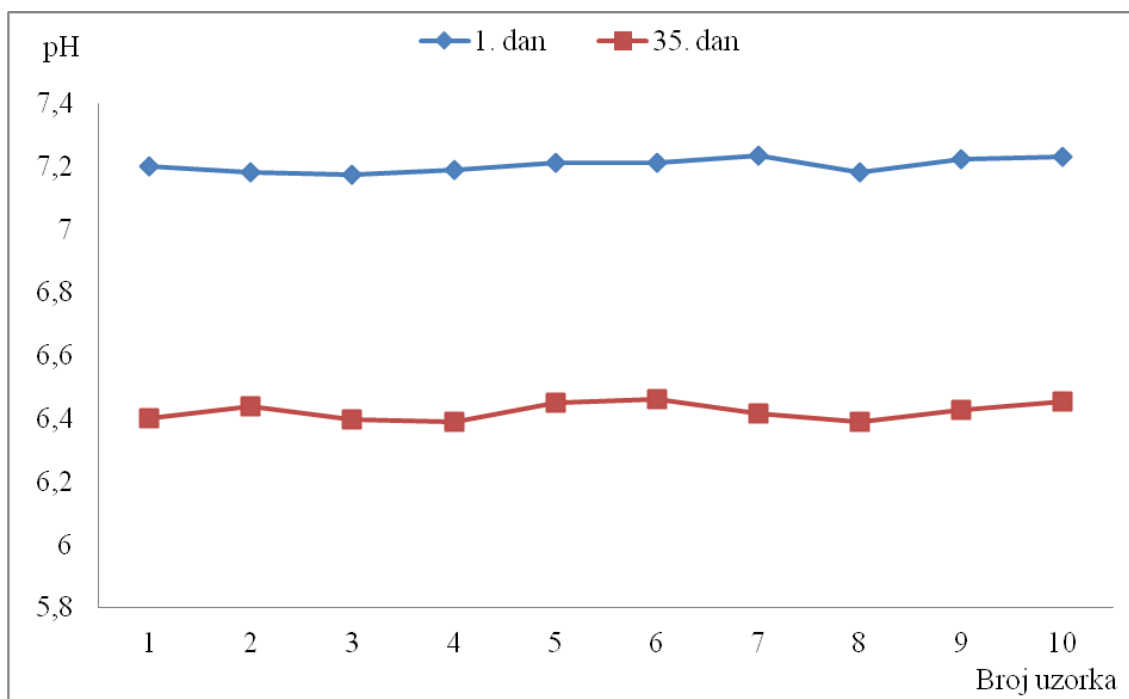
2. mjerenje 35. dana skladištenja pripravaka



Slika 9: Prikaz izmjerenog AST-a u 10 koncentrata eritrocita 1. i 35. dana čuvanja



Slika 10: Prikaz izmjerenog LDH u 10 koncentrata eritrocita 1. i 35. dana čuvanja



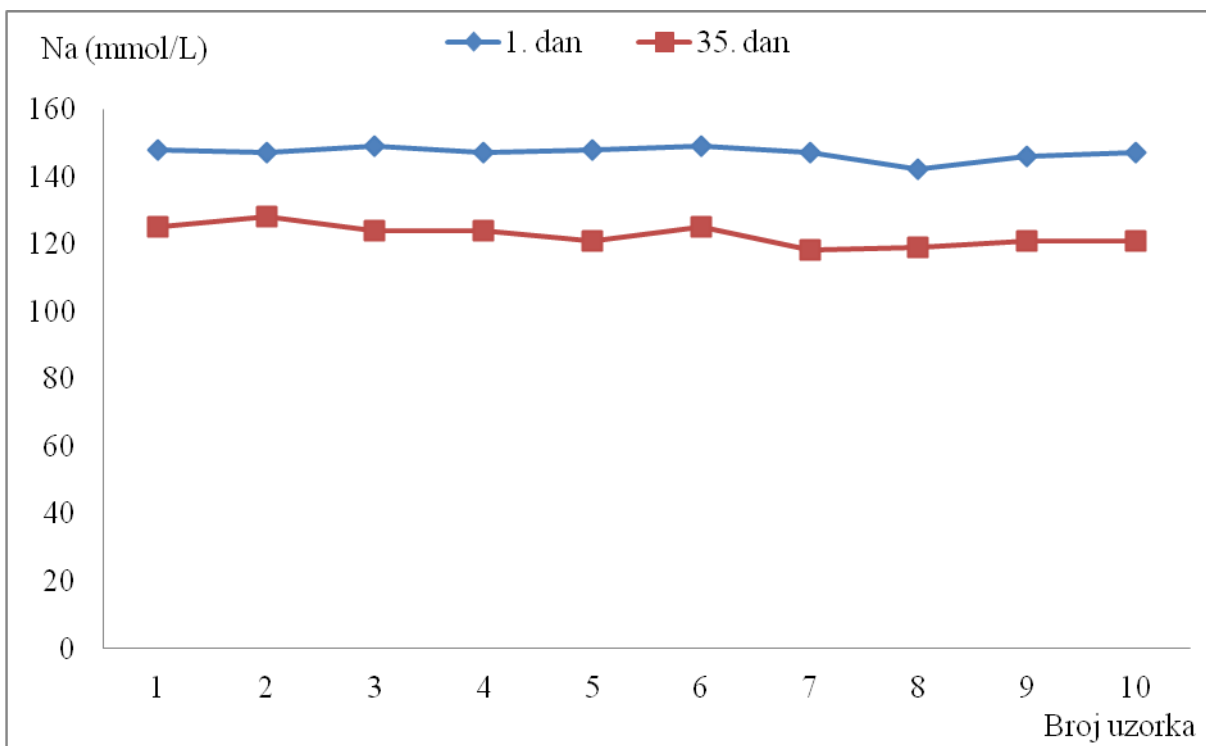
Slika 11: *Prikaz promjena pH u 10 koncentrata eritrocita 1. i 35. dana čuvanja*

Tablica 9. Promjene koncentracije Na, K i Cl u koncentratima eritrocita prvog i zadnjeg dana čuvanja

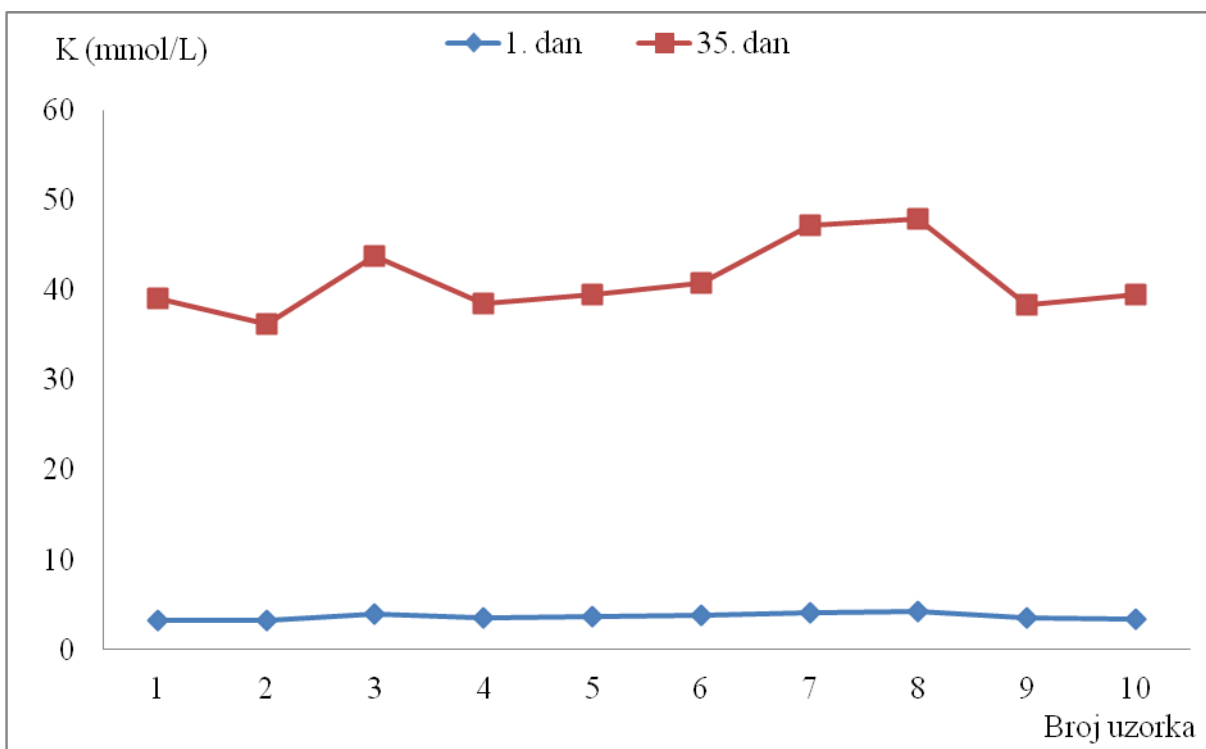
<i>Broj uzorka</i>	Na (mmol/L)		K (mmol/L)		Cl (mmol/L)	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.
1	148	125	3.3	39	116	105
2	147	128	3.3	36.2	119	110
3	149	124	4.0	43.8	115	106
4	147	124	3.5	38.4	119	106
5	148	121	3.6	39.5	117	107
6	149	125	3.8	40.8	114	100
7	147	118	4.1	47.1	116	102
8	142	119	4.2	47.9	111	99
9	146	121	3.5	38.3	119	106
10	147	121	3.4	39.4	118	107
<i>Prosjek ± SD</i>	147 ±2	122.6 ±3.09	3.67 ±0.33	41.04 ±3.92	116.4 ±2.59	104.8 ±3.42

1. mjerenje 1. dana skladištenja pripravka

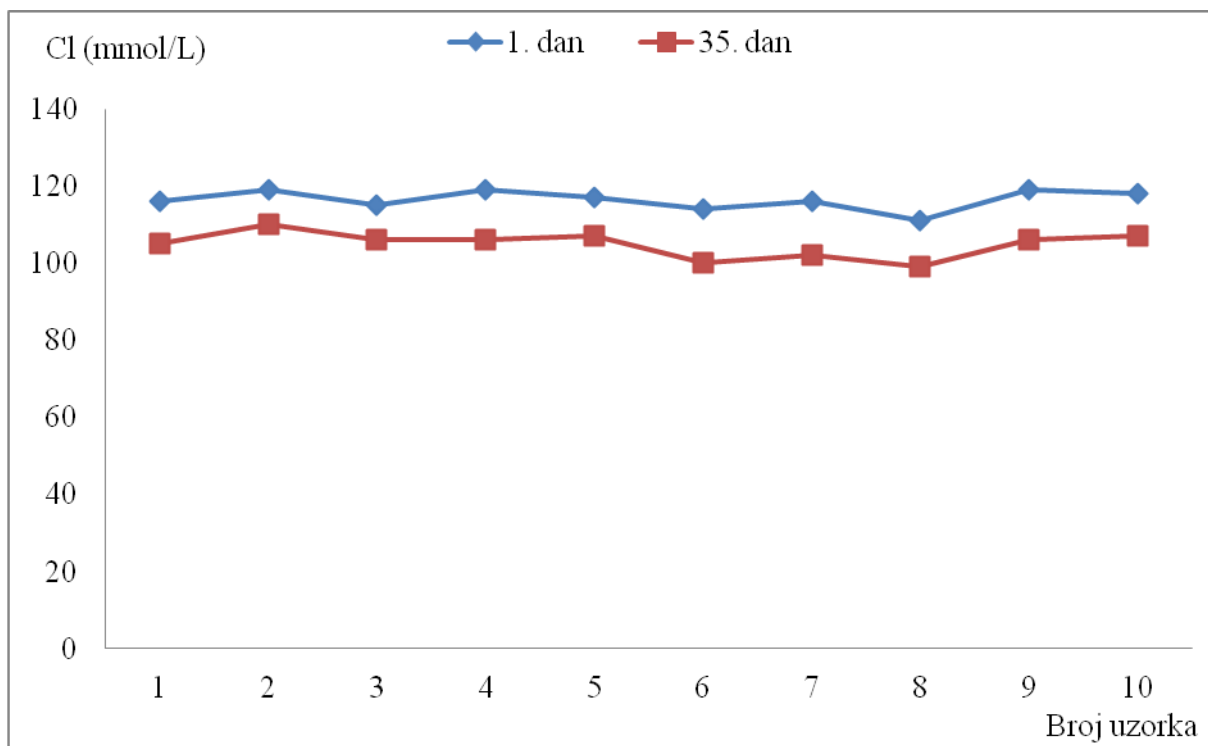
2. mjerenje 35. dana skladištenja pripravka



Slika 12: *Prikaz promjene koncentracije natrija u 10 koncentrata eritrocita 1. i 35. dana čuvanja*



Slika 13: *Prikaz promjene koncentracije kalija u 10 koncentrata eritrocita 1. i 35. dana čuvanja*



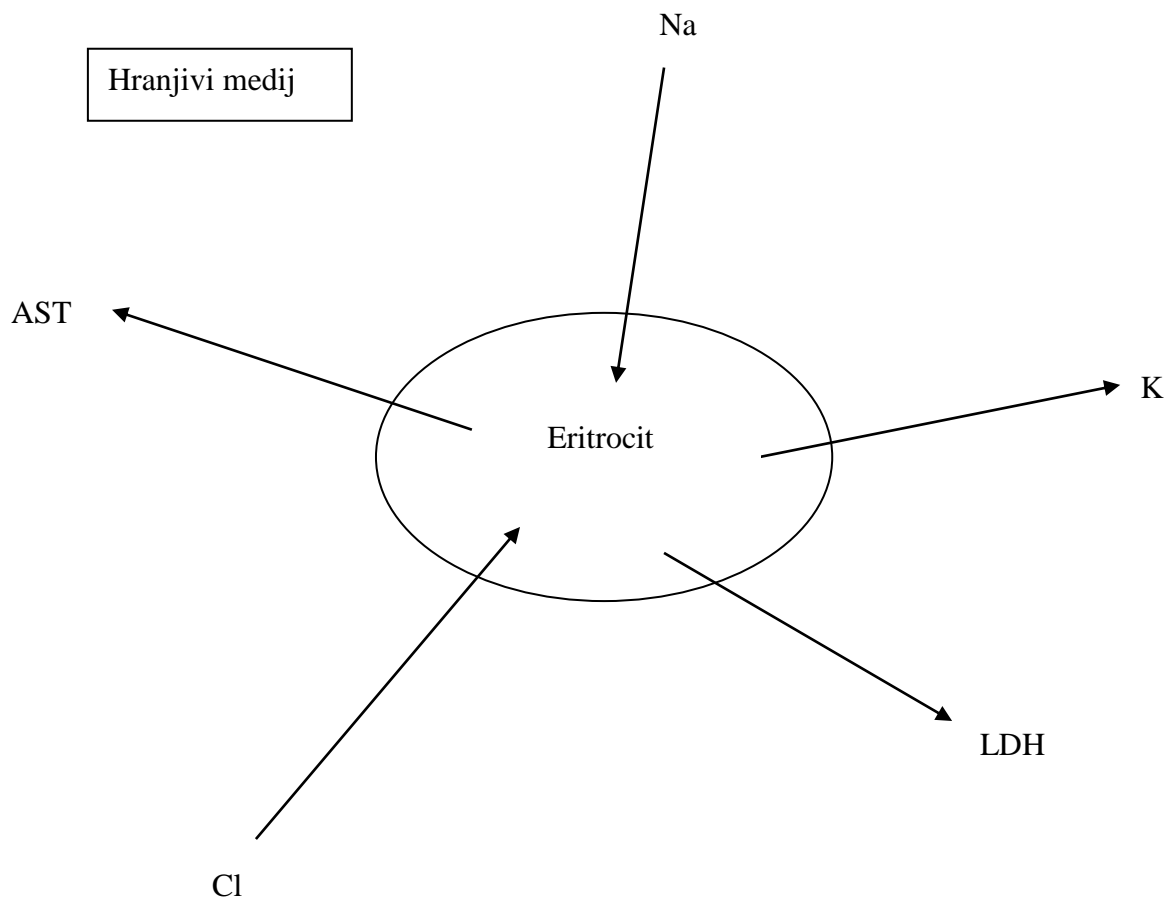
Slika 14: *Prikaz promjene koncentracije klora u 10 koncentrata eritrocita 1.i 35. dana čuvanja*

5. RASPRAVA

I u ovom je radu kao i u brojnim dosadašnjim istraživanjima utvrđeno da duljina vremena skladištenja koncentrata eritrocita pogoduje razvoju različitih promjena na eritrocitima i u hranjivom mediju s kojim su pomiješani. Naime, krv i krvni sastojci čuvaju se u uvjetima koji nisu fiziološki. Dodir s antikoagulantnom otopinom i stijenkom plastične vrećice djeluje na stanice i proteine u pripravku. I tijekom pripreme i tijekom skladištenja pripravaka događaju se brojne metaboličke, biokemijske i molekularne promjene svih sastojaka koncentrata koje ovise o antikoagulantnoj otopini, centrifugiranju, temperaturi i dužini vremena čuvanja. Iako im se kratkotrajno može povećati funkcija, većina krvnih sastojaka ipak s vremenom gubi svoju funkciju. Stanice se raspadaju a iz njih izlaze razne tvari od kojih neke mogu biti i štetne za bolesnika.

Strukturalne promjene eritrocita u eritrocitnim koncentratima uključuju oštećenja membrane, membranskih proteina i lipida (9) čime je smanjena fleksibilnost njihove membrane i promijenjena njezina biološka funkcija. U eritrocitima se smanjuju koncentracije ATP-a i 2,3-DPG-a (10) zbog čega se mijenja volumen i funkcionalnost eritrocita. Oštećenje stanica uzrokuje nakupljanje metaboličkih produkata i različitih bioloških supstanci u hranjivom mediju s kojim su eritrociti pomiješani što je uzrok povišenja vrijednosti K, LDH i AST-a u koncentratima eritrocita tijekom čuvanja (slika2.).

Slika 2. Promjene koje se događaju u eritrocitima tijekom skladištenja



Promjene na membrani eritrocita primijećene su u prvih 7-14 dana skladištenja koncentrata eritrocita zbog čega se već u tom ranom periodu čuvanja javlja sniženi ekstracelularni pH (11) uzrokovan povišenom koncentracijom laktata, konačnog produkta anaerobnog metabolizma eritrocita (12). Uz hemolizu eritrocita koja se javlja tijekom čuvanja uočeno je i da se s duljim vremenom skladištenja koncentrata eritrocita razvijaju brojni mikroagregati u pripravku te različite stanične subpopulacije kao što su ehinociti, sfero-ehinociti, sferociti, shistociti te razni nespecifični oblici i fragmenti (11). Dosadašnja istraživanja također potvrđuju prorast hemolize tijekom vremena čuvanja koncentrata eritrocita no njen maksimum ipak ne prelazi dozvoljene granice određene važećim Europskim i svjetskim smjernicama (13).

Nakon 35 dana skladištenja mijenja se volumen eritrocita te koncentracija hemoglobina u litri eritrocita, MCHC. Iako je i u ovom radu dokazan porast MCV-a nakon tridesetpetog dana čuvanja koncentrata eritrocita *R.B.Savant i sur.* zaključuju da nema korelacije između MCV-a i duljine vremena skladištenja pripravaka ili tipa donacijskih

vrećica i aditivnih otopina. *Nakao i sur.* u svom istraživanju također dolaze do sličnih zaključaka (16,17). *C.A. Cluitmans i M.R. Hardeman* u svojoj studiji na svježe izoliranim eritrocitima različitih volumena i gustoće zaključuju da je hiperbola osmotske rezistencije koja u velikoj mjeri ovisi o MCHC-u kod eritrocita in vivo pomaknuta u lijevo. To ukazuje na povišeni MCHC i smanjenu osmotsku rezistenciju eritrocita. No, u pripravcima koncentrata eritrocita pomak ove krivulje je u desno što je rezultat sniženog MCHC-a i suprotnog učinka na osmotsku rezistenciju (14).

Koncentracije intracelularnog i ekstracelularnog Na i K također se mijenjaju s vremenom čuvanja koncentrata eritrocita. Naime, Na^+/K^+ pumpa je inaktivna na 4°C čime je omogućen priljev natrija u stanice te gubitak kalija iz stanica (15).

Ovo istraživanje je provedeno na relativno malom broju uzoraka ali je uspjelo potvrditi da se tijekom čuvanja koncentrata eritrocita događaju promjene u krvnom pripravku na koje treba ozbiljno računati kod liječenja pacijenata koncentratima eritrocita koji su pred kraj roka valjanosti. Posebno o tome treba voditi računa kod pacijenata koji u kraće vrijeme prime više doza koncentrata eritrocita koji su pred kraj roka valjanosti jer mogu nastati metaboličke promjene koje nepovoljno utječu na ishod liječenja.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju ovog istraživanja može se zaključiti:

1. Transfuzija eritrocitnih krvnih pripravaka se najčešće primjenjuje kod liječenja anemija, kirurških i životno ugroženih bolesnika što ove pripravke svrstava u najznačajnije proizvode u transfuzijskoj djelatnosti.
2. Proizvodnjom koncentrata eritrocita dobivamo veću količinu eritocita u manjem volumenu, bez krvnih sastojaka koji bolesniku nisu potrebni u liječenju
3. Čuvanje koncentrata eritrocita je u uvjetima koji su za njih optimalni i koji sprječavaju propadanje stanica.
4. Iako hranjiva otopina u koncentratima eritrocita i optimalna temperatura čuvanja sprječavaju oštećenje i propadanje eritrocita, ipak tijekom čuvanja eritrociti doživljavaju metaboličke, biokemijske i strukturalne promjene.
5. Najznačajnije promjene u razdoblju skladištenja eritrocitni krvni pripravci pokazuju u porastu koncentracija K, LDH i u sniženju pH.
6. Kako se posljednjih godina intenzivno radi na razvoju i poboljšanju pripreme eritrocitnih krvnih pripravaka tako i ovaj rad doprinosi proširenju spoznaja o utjecaju vremena čuvanja koncentrata eritrocita na njihovu kvalitetu.

7. LITERATURA

1. Labar B, Hauptmann E i sur: *Hematologija*. Zagreb, 2007. Školska knjiga.
2. Grgičević D: *Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi*. Zagreb, 2006. Medicinska naklada
3. Grgičević D, Vuk T: *Imunohematologija i transfuzijska medicina*. Zagreb, 2000 Medicinska naklada
4. Grgičević D, Skodlar J, Šarlija D: *Preporuke za transfuzije krvi i krvnih pripravaka u kliničkoj medicini*. Zagreb, 1998.
5. Gamulin S *Patofiziologija*. Zagreb, 2005. Medicinska naklada.
6. *Pravilnik o krvi i krvnim sastojcima*, "Narodne novine" broj 124/97
7. *Zakon o krvi i krvnim pripravcima*, članak 30. (NN 79/06 i 124/11)
8. Marušić M: *Uvod u znanstveni rad u medicini*. Zagreb, 2013. Medicinska naklada.
9. Aubron C, Nichol A, Cooper DJ, Bellomo R: *Age of red blood cells and transfusion in critically ill patients*. Ann Intensive Care. 2013 Jan 15;3(1):2
10. Gustaf Edgren, Mads Kamper-Jørgensen, Sandra Eloranta, Klaus Rostgaard, Brian Custer, Henrik Ullum, Edward L Murphy, Michael P Busch, Marie Reilly, Mads Melbye, Henrik Hjalgrim, Olof Nyrén: *Duration of Red Blood Cell Concentrate Storage and Survival of Transfused Patients*. Transfusion. 2010 June; 50(6): 1185–1195
11. Brad S. Karon, Camille M. van Buskirk, Elizabeth A. Jaben, James D. Hoyer, David D. Thomas: *Temporal sequence of major biochemical events during Blood Bank storage of packed red blood cells*. Blood Transfus. 2012 October; 10(4): 453–461.
12. Mukherjee S, Marwaha N, Prasad R, Sharma RR, Thakral B. *Serial assessment of biochemical parameters of red cell preparations to evaluate safety for neonatal transfusions*. Indian J Med Res 2010;132:715-20
13. Makroo R N, Raina V, Bhatia A, Gupta R, Majid A, Thakur UK, Rosamma N L. *Evaluation of the red cell hemolysis in packed red cells during processing and storage*. Asian J Transfus Sci 2011;5:15-7
14. Judith C.A. Cluitmans, Max R. Hardeman, Sip Dinkla, Roland Brock, Giel J.C.G.M. Bosman *Red blood cell deformability during storage: towards functional proteomics and metabolomics in the Blood Bank*. Blood Transfus. 2012 May; 10, s12- s18.

15. Julien Delobel, Olivier Rubin, Michel Prudent, David Crettaz, Jean-Daniel Tissot and Niels Lion: *Biomarker Analysis of Stored Blood Products: Emphasis on Pre-Analytical Issues*; International Journal of Molecular Sciences , 2010, 11(11), 4601-4617
16. R. B. Sawant, S. K. Jathar, S. B. Rajadhyaksha, P. T. Kadam: *Red cell hemolysis during processing and storage*. Asian J Transfus Sci. 2007 Jul-Dec; 1(2): 47–51.
17. Nakao M, Hoshino K, Nakao T. *Constancy of cell volume during shape change of erythrocytes induced by increased ATP content*. J Bioenerg Biomembr. 1981;13:307–16.

8. SAŽETAK

Uvod: Pripravci eritrocita najznačajniji su proizvod u transfuzijskoj djelatnosti. Koriste se u liječenju anemija, kirurških i životno ugroženih bolesnika. Očuvanje funkcije i kvalitete ovih priprvaka jedan je od preduvjeta uspješnog transfuzijskog liječenja.

Cilj: Svrha ovog rada je utvrditi biokemijske i hematološke promjene koje nastaju tijekom čuvanja koncentrata eritrocita u optimalnim uvjetima.

Materijali i metode: U deset koncentrata eritrocita proizvedenih standardiziranim postupkom ispitani su hematološki (E, Hct, Hb, MCV, MCH i MCHC) i biokemijski (AST, LDH, Na, K, Cl i pH) parametri prvog i 35. dana skladištenja. U tu svrhu korišteni su hematološki analizator Advia 2102i, biokemijski analizator Beckman Coulter AU680 te RapidLab 1265 sistem za mjerenje pH. Statistička obrada podataka izvršena je Microsoft Excel 2007 programskom podrškom.

Rezultati: Tijekom skladištenja koncentrata eritrocita broj eritrocita, hemoglobin i MCH nisu se značajno promijenili. Hct i MCV su nešto porasli dok je MCHC na dan isteka roka valjanosti pripravka snižen. Posljednjeg dana čuvanja koncentrata značajno su porasli AST, LDH i K. pH je u tom razdoblju osjetno pao a zabilježen je i pad koncentracije Na i Cl.

Zaključak: Najznačajnije promjene u razdoblju skladištenja eritrocitni krvni pripravci pokazuju u porastu koncentracija K, LDH i u sniženju pH. To je važna spoznaja koju treba uzeti u obzir kod liječenja pacijenata koncentratima eritrocita pred kraj roka valjanosti.

Ključne riječi: koncentrat eritrocita, skladištenje, promjene

9. SUMMARY

Introduction: RBC concentrates are the most important product in the transfusion activities. They are used to treat anemia, surgical and critically ill patients. Preserving function and quality of these products is one of the conditions for a successful transfusion therapy.

Objective: The purpose of this study was to determine the biochemical and hematological changes that occur during storage of packed red blood cells in optimal conditions

Materials and Methods: In ten packed red blood cells produced by standardized procedure we examined hematological (E, Hct, Hb, MCV, MCH and MCHC) and biochemical (AST, LDH, Na, K, Cl and pH) parameters on the first and 35th day of storage. In this purpose we used Advia 2102 hematology analyzer, biochemistry analyzer Beckman Coulter AU680 and RapidLab 1265 system for measuring pH. Statistical analysis was performed by Microsoft Excel 2007 program support.

Results: During the storage of packed red blood cells number of erythrocytes, hemoglobin concentration and MCH were not significantly changed. Hct and MCV were slightly increased while the MCHC on the 35th day of storage was lowered. On the last day of concentrate storage AST, LDH and K were significantly increased. It was also observed a reduction of the pH value, Na and Cl.

Conclusion: The most significant changes in the storage period erythrocyte blood products show in increasing concentrations of K, LDH and decreasing of pH. This is an important finding that must be considered in the treatment of patients with erythrocyte concentrates at the end of the storage period.

Keywords: packed red blood cells, storage, changes

10. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODATCI

Ime i prezime: Vladimira Martić

Datum rođenja: 06. kolovoza 1968.

Adresa stanovanja: Ruđera Boškovića 20, Split

Telefon: 021/470-894

Mobitel: 098/1674 163

E-mail: vlatkamartić@gmail.com

OBRAZOVANJE

1975-1979 Osnovna škola „Rade Vranić Petar“, Kostrena

1979-1983 Osnovna škola „Pećine“, Rijeka

1983-1987 Centar usmjerenog obrazovanja za kadrove u zdravstvu „Mirko Lenac“,
Rijeka

1999-2002 Visoka učiteljska škola, Rijeka

2011- Preddiplomski studij MLD, Odjel zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu

AKTIVNOSTI

2005. članica Organizacijskog odbora simpozija Hrvatske laboratorijske udruge
u Splitu

2013. autorica i prezentatorica na 2. kongresu Hrvatske komore zdravstvenih radnika
strukovnog razreda za medicinsko laboratorijsku djelatnost u Zagrebu

OSTALO

1978-1985 dobitnica nekoliko nagrada i priznanja za osobite uspjehe i dostignuća
u taekwondo sportu

